

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 11 月 15 日 (15.11.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/86301 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/543, 21/76 (74) 代理人: 弁理士 小田島平吉, 外(ODAJIMA, Heikichi et al.); 〒107-0052 東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館 小田島特許事務所 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/03886
- (22) 国際出願日: 2001 年 5 月 10 日 (10.05.2001) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2000-138472 2000 年 5 月 11 日 (11.05.2000) JP
- (71) 出願人 および  
(72) 発明者: 片岡一則 (KATAOKA, Kazunori) [JP/JP]; 〒165-0031 東京都中野区上鷺宮5-17-22 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 長崎幸夫 (NAGASAKI, Yukio) [JP/JP]; 〒302-0128 茨城県北相馬郡守谷町けやき台3-5-17 Ibaraki (JP). 大塚英典 (OTSUKA, Hidenori) [JP/JP]; 〒211-0034 神奈川県川崎市中原区井田中ノ町11-13 Kanagawa (JP). 金子充弘 (KANEKO, Mitsuhiro) [JP/JP]; 〒274-0802 千葉県船橋市八木が谷3-8-3 Chiba (JP).
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: POLYMER COMPOSITION FOR FORMING SURFACE OF BIOSENSOR

(54) 発明の名称: バイオセンサーの表面形成用ポリマー組成物

(57) Abstract: A polymer composition containing a polymer or copolymer which has a mercapto group at one end and a functional group or ligand at the other end and has a polyethylene glycol segment. The composition can form a biosensor surface reduced in non-specific adsorption of a protein, etc.

(57) 要約:

片末端にメルカプト基を有し、他の片末端に官能基またはリガンドを有し、かつポリエチレングリコールセグメントを有するポリマーまたはコポリマーを含有するポリマー組成物が提供される。かような組成物は、タンパク質等の非特異的吸着性の低減したバイオセンサー表面を形成することができる。

WO 01/86301 A1

BEST AVAILABLE COPY

## 明 細 書

## バイオセンサーの表面形成用ポリマー組成物

## 技術分野

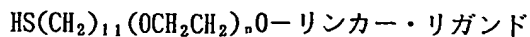
本発明は、表面プラズモン共鳴（SPR）を応用したバイオセンサーの表面を  
5 形成するためのポリマー組成物、かようなポリマーを吸収（または吸着）された  
バイオセンサーチップ表面、および該組成物を用いるバイオセンサーチップの作  
製方法に関する。

## 背景技術

表面プラズモン共鳴（SPR）は、金属薄膜の表面およびその近傍における屈  
10 折率変化に対して敏感である（例えば、A. Szabo et al., Cur  
r. Opin. Struct. Biol. 5 (1995) 699-705参照）。  
SPRは、表面と複雑な生物学的溶液との間で生じる過程のインサイチュ（in  
s i t u）での観察が可能であり、かつ、例えば標識を使用することなくリア  
ルタイムに被検体からのデータが入手でき、そして動力学的および熱力学的なパ  
15 ラメーターを取得するのに適している。表面に固定される生体分子が固定される  
層の曲折率の変化をもたらす場合には、SPRで該生体分子の配座上の変化も検  
出できる。

このような表面をもつバイオセンサーチップの典型的なものとしては、アマシャ  
ム ファルマシア バイオテク（株）から入手できるB I A C O R Eがある。こ  
20 のB I A C O R Eは、末端がカルボキシル化されたデキストランのマトリックス  
が半透明の金の薄膜上に固定されているチップである。このようなデキストラン  
マトリックスは、タンパク質の非特異的吸着に対してある程度の抵抗性を示すが、  
かなりの厚さ（約100nm）をもつために、例えば、被検体が該マトリックス  
中に分配される等により、熱力学的および動力学的パラメーターに悪影響を及ぼ  
25 す場合がある。

他方、E. Ostuni, et al., Colloids and Sur  
face B: Biointerfaces 15 (1999) 3-30におい  
て、一般式



(式中、 $n$ は2～7の整数である)

- で表されるポリマーを、ガラス支持体上に蒸着させたチタンの薄層(1～5 nm)上にさらに付着させた金層(12 nm)上に自動堆積単層(self-assembled monolayer)を担持するチップを公表している。上記総説
- 5 において、著者らは、エチレングリコール単位を2～7個有する上記ポリマーで形成された単層はタンパク質の吸着に対して抵抗性を示すことを示唆している。そして、この結果は、例えば、トリクロロビニルシランで変性されたガラス上にポリエチレングリコール(PEG)をグラフトした場合には、PEG鎖が短くなればなる程、タンパク質の吸着に対する抵抗性が低下するとの理論的な予測(S. I. Jeon, et al., J. Colloid Interface Sci. 142 (1991) 149-158)に一致しないことを示唆している。
- 10

しかし、E. Ostuniらが提案しているPEG単位の小さいポリマーは、金属薄膜表面の影響を受け、特定のタンパク質(例えば、全体として陽性の電荷をもつもの)等を非特異的に吸着する場合がある。

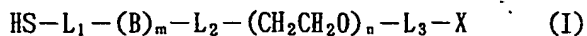
15 発明の開示

本発明の目的は、E. Ostuniらのポリマーに比べ、いかなるタンパク質の非特異的吸着も有意に低減し、しかもBIA COREのデキストランマトリックスを用いるときの上記短所が解消されたかまたは有意に改善されうるSPR用ポリマー組成物を提供することにある。

- 20 本発明者らは、上記E. Ostuniらのポリマーに比べて、形成されるポリマーマトリックスの層の厚さが遥かに厚くなることが予測されるのにもかかわらず、オリゴマーよりはむしろポリマーの範疇に入るPEOセグメントを有する特定のポリマーを金属薄膜上に化学吸収(または吸着)させると、タンパク質を初めとする生体由来の成分の非特異的な吸着を有意に低減できることを見出した。

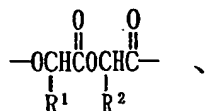
- 25 したがって、本発明は、該特定のポリマー(すなわち、下記一般式(I)で表されるポリマー)を有効成分として含んでなる表面プラズモン共鳴(SPR)を応用したバイオセンサーの表面を形成するためのポリマー組成物、ならびに該ポリマーを表面に吸着したSPRを検出するためのバイオセンサーチップを提供する。

一般式 (I) :

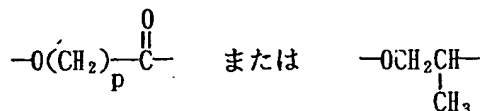


上式中、 $\text{L}_1$ 、 $\text{L}_2$ および $\text{L}_3$ は独立して、原子価結合またはリンカーを表し、  
但し、 $m$ が0である場合には、 $\text{L}_1$ と $\text{L}_2$ は一緒になって原子価結合または1個の  
5 リンカーとなることができ、

Bは式



10



を表し、ここで $\text{R}^1$ および $\text{R}^2$ は独立して、水素原子、炭素原子1～5個のアルキ  
ル基であり、そして $p$ は2～5の整数であり、

15

$x$ は水素原子、官能基またはリガンドを表し、

$m$ は0～10,000の整数であり、そして

$n$ は10～20,000の整数である。

20

別の態様の本発明は、上記一般式 (I) で表されるポリマーを含有するポリマ  
ー組成物の溶液もしくは懸濁液で金、銀、白金およびアルミニウムからなる群よ  
り選ばれる表面を有するセンサーチップを処理し、該ポリマーを、そのポリマー  
中のメルカプト基を介して該表面に化学吸着または化学吸収させ、次いで必要に  
より、該ポリマー中の官能基 $X$ を介してリガンドを共有結合させることを特徴と  
するSPRを応用するバイオセンサーチップの作製方法を提供する。

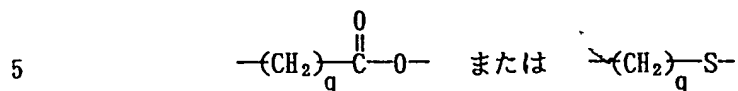
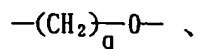
25

また、別の態様の本発明は、SPRを応用したバイオセンサーチップの表面を  
作製するための一般式 (I) で表されるポリマーの使用も提供する。

#### 発明を実施するための最良の形態

一般式 (I) で表されるポリマーそれら自体は、殆ど公知であり、また、仮り  
に新規なポリマーであっても、類似の公知ポリマーに準じて製造できる。これら  
のポリマーで好ましいものとしては、一般式 (I) における $m$ が0～10,000

0であり、 $L_1$ が原子価結合、



のリンカーを表すか、あるいはmが0である場合には、 $L_1$ と $L_2$ は一緒になって、  
上記で $L_1$ について定義したリンカーであることができ、ここで、qは2～6の  
整数であり、あるいはmが0以外の場合には、 $L_2$ は-O-または-O-CH<sub>2</sub>C

10 H<sub>2</sub>-O-であり、

$L_3$ が原子価結合またはまたは $-(CH_2)_r-$ であり、ここでrは1～6の整数で  
あり、そして

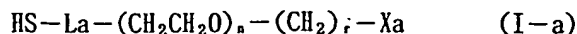
xが水素原子、アルデヒド基(-CHO)、水酸基、アミノ基、



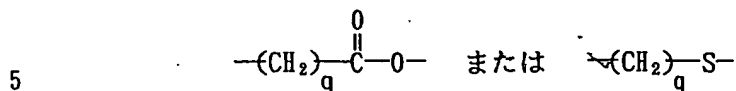
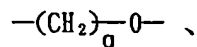
(ここで、 $R^3$ および $R^4$ は独立してC<sub>1-10</sub>アルキル基を表すか、あるいは $R^3$ と  
 $R^4$ は一緒になって、C<sub>1-6</sub>アルキルで置換されていてもよいエチレン基を形成す  
る原子団である)、-NR<sup>5</sup>R<sup>6</sup> (ここで $R^5$ および $R^6$ は独立して、水素原子また  
20 はC<sub>1-6</sub>アルキル基であり、但し、 $R^5$ および $R^6$ はいずれか一方が水素原子以外  
である)、アクリロイル基、メタクリロイル基、ビニルベンジル基、アリル基お  
よびp-トルエンスルホン基からなる群より選ばれる官能基、または糖残基、  
ビオチン、抗原もしくは抗体および核酸からなる群より選ばれるリガンドを表す、  
ものを挙げることもできる。

25 本発明で使用するポリマーの好ましいもののうち、一般式(I)におけるmが  
0であるポリマーを例にすると、次の一般式(I-a)で示されるものを挙げる  
ことができる。

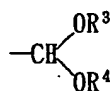
一般式(I-a) :



上式中、L a は



を表し、q は 2～6 の整数であり、X a は、アルデヒド基または



10

(ここで、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は独立してC<sub>1-10</sub>アルキル基を表すか、あるいはR<sup>3</sup>とR<sup>4</sup>は一緒になってC<sub>1-6</sub>アルキル基で置換されていてもよいエチレン基を形成する原子団である)であり、

n は 10～20,000 の整数であり、そして

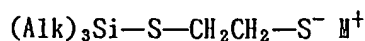
15 r は 1～6 の整数である。

これらのポリマーは、例えば、WO96/32434、WO96/33233、WO97/06202、特開平11-322916号公報、特開平11-322917号公報に記載されているポリマーそれら自体またはそれらの前駆体を、必要により、それ自体公知の方法によって修飾することによって製造することができる。

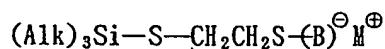
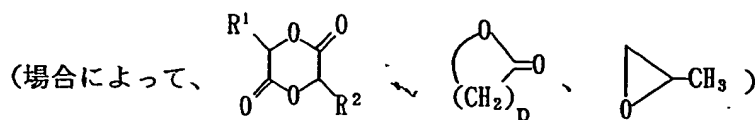
20

限定されるものでないが、一般式(I)の片末端にメルカプト基を有し、他の末端に官能基またはリガンドを有するポリマーの製造は、下記の反応スキームに従って行うことが好都合であろう。それぞれ各工程は、それら自体公知の方法に準じて実施することができる。

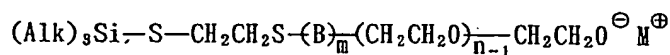
25 スキーム I (特開平11-322917号参照) :



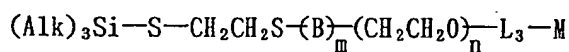
5



10

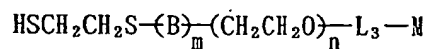


求電子剤 A-X



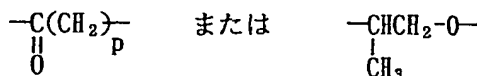
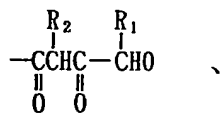
脱シリル化

15



なお、上記各式中、AlkはC<sub>1-6</sub>アルキル基であり、M<sup>+</sup>はカリウムイオンであり、Aはハロゲン等の脱離基であり、そしてR<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、X、n、mおよびL<sub>3</sub>は上記に定義したとおりであり、Bは

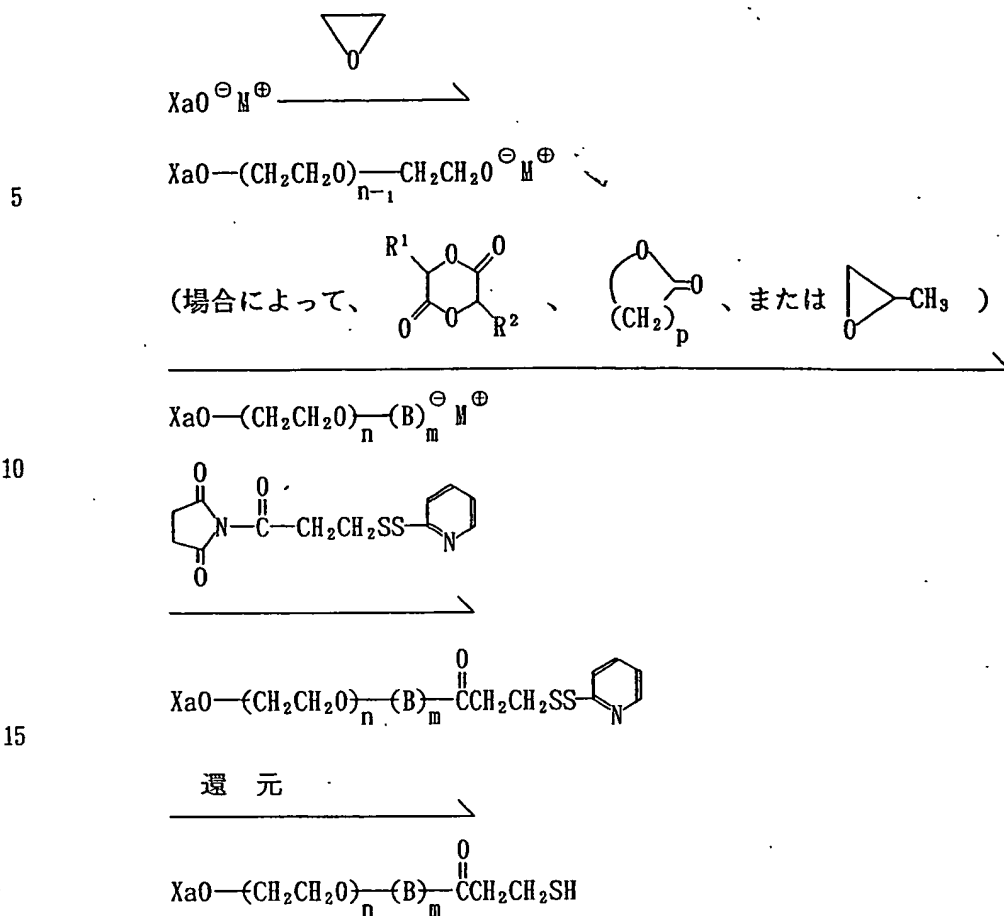
20



25

である。

スキーム I I (前駆体ポリマーの製造については、WO 96/32434、WO 96/33233、WO 97/06202参照) :



20     なお、上記各式中、X a は X-L<sub>3</sub> であり、その他の略号は、上記と同じ意味を有する。

本明細書において、アルキル基は、分枝していてもよいアルキル基を意味し、「アルキル基」の語に先立つ C<sub>1-6</sub> または C<sub>1-10</sub> は、それぞれアルキル基が有する炭素原子の数が 1~6 であるか 1~10 個であることを意味する。したがって、  
 25     限定されるものでないが、かかるアルキル基の例としては、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシル、n-オクチル、n-デシル等が挙げられる。

また、本発明にいうリガンドは、生物学的なコンジュゲート（複合体）を形成しうる結合対の一方であることができる。例えば、ビオチン-アビジン複合体の



ビオチン、糖-レクチン複合体における糖、抗原-抗体複合体における抗原または抗体、核酸-核酸ハイブリッドにおけるいずれかの核酸を挙げることができる。

- これらのリガンドは、一般式 (I) のポリマーの片末端に存在する官能基（例えば、アルデヒド基）をリガンド中のアミノ基との反応を利用して、該ポリマーの
- 5 片末端に導入することができる。また、このようなりガンドの導入は、官能基を片末端に有するポリマーを、後述するように、金属表面に固定した後に、行ってもよい。

本発明に従えば、ポリエチレンセグメントを形成する  $n$  は、10以上、好ましくは10~2500、より好ましくは50~500である。

- 10 上記のように、片末端にメルカプト基を有する一般式 (I) のポリマーは、様々な溶媒、例えば、テトラヒドロフラン、低級アルカノール（例、エタノール）、ジメチルホルムアミド、トルエン、キシレン等に安定に溶解もしくは分散できる。一般式 (I) のポリマーをこうした溶媒に溶解もしくは分散させたものは、本発明にいう、SPRを応用したバイオセンサーの表面を形成するためのポリマー組
- 15 成物の一態様である。かようなポリマー組成物には、1種以上のポリマーを含めることができ、また、必要により、他の添加剤、例えば該表面に前記ポリマーを高密度で固定できるような硫酸カリウム等の無機塩を含めてもよい。

- こうして調製されるポリマー組成物は、一般的に、いかなる形態であってもよく、ガラスまたはシリコンウェファー上に、必要により金、銀、アルミニウム等
- 20 の接着性を改善するためにチタンの薄膜を蒸着した後、金、銀、白金、パラジウム、アルミニウムの層を堆積させたチップと接触させて、金、銀または白金上に化学吸収（または吸着）させることができる。化学吸収（または吸着）は、理論によって拘束されるものでないが、ポリマーのメルカプト基と金属表面との反応による金属-チオレート（以下、複合体ともいう）の形成を介して起こるものと、
- 25 理解されている。この吸収（または吸着）は、例えば、半透明の金薄膜を担持する支持体を、上記ポリマー溶液中に浸漬するかまたは該支持体表面にポリマー溶液を流がすことによって行う。処理温度は、使用するポリマーの種類によって最適温度が変動するが、一般的に溶媒の融点から沸点までの間であることができる。なお、操作上の都合を考慮すると、室温付近が好適である。室温付近で処理する

場合、金属表面とポリマー溶液との接触時間は、通常、30分程度で十分であるが、1～24時またはそれ以上の時間であってもよい。こうして、一般式(I)のポリマーが金属表面に吸収(または吸着)されるが、必要により未吸収または未吸着のポリマーは洗浄除去してもよい。

- 5     ポリマー溶液のポリマー濃度は、ポリマーが溶解もしくは均一に分散している状態にあれば、何等限定されないが、一般に、10～200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  が好ましい。

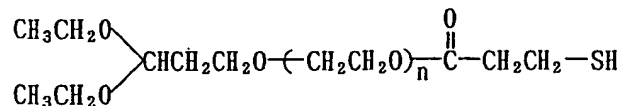
- 以上によって形成される一般式(I)のポリマーがメルカプト基を介して化学吸収(または吸着)された金属表面(例えば、センサーチップ表面)は、適度な鎖長のポリエチレングリコールセグメントに覆われるので、金属表面からの直接的な影響を実質的に受けず、表面電荷がゼロないしは限りなくゼロ近くなるものと考えられる。したがって、本発明の組成物で形成された金属表面では、例えば10未満のエチレングリコール単位からなる末端を有するアルキレンチオールで被覆された金属表面においてしばしば観察される表面電荷に起因する生体由来の分子種(例、正荷電したタンパク質)等の非特異的吸着は実質的に生じない。
- 10     15

以下、具体例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、これらの例に本発明を限定することを意図するものではない。なお、下記の例において、ポリエチレンセグメントはPEGと略記する。

製造例1 片末端にメルカプト基、他末端にアセタール基を有するヘテロテレケ

- 20     リックPEGを有するポリマーの合成

1. アセタール-PEG-SH ( $M_n = 5000$ ) の合成



25

アルゴン置換した受器中に蒸留テトラヒドロフラン(THF) 20mlと開始剤3,3-ジエトキシ-1-プロパノール0.2mmol(0.032ml)を加え、さらに当量のカリウムナフタレンを加えて15分攪拌することでメタル化を行った。その後、エチレンオキシド22.7mmol(1.135ml)を加え、室温

で2日間攪拌し重合させた。停止剤としてN-スクシンイミゾル-3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート(SPDP) 0.4 mmol (0.125 g)を少量の蒸留THFに溶解せき、この溶液に対し前記の重合反応溶液を等圧滴下漏斗にて氷冷下で滴下した。一晚攪拌して停止反応を行った後に、飽和食塩水洗浄・クロロホルム抽出、エーテル再沈、ベンゼン凍結乾燥を経て、ポリマーを回収した。回収したポリマーは<sup>1</sup>H-NMRにて構造を確認し、末端に導入されたSPDP残基の量は、2-メルカプトエタノールと反応させることによって遊離した2-チオピリドンのUV吸収によっても確認した。

PEG-SS-Py  $2.0 \times 10^{-2}$  mmol (100 mg)を蒸留水4 mlに溶解させ、さらに5倍mol量のジチオトレイトール0.1 mmol (15.42 mg)を加え、室温で30分攪拌した。反応後、飽和食塩水洗浄・クロロホルム抽出・エーテル再沈を経てポリマー(以下、PEG5000と略記する)を回収した。回収したポリマーは<sup>1</sup>H-NMRによって構造を確認し、さらに2-ピリジジスルフィド(2-PDS)との反応により、末端SH基の定量を行った。

さらに、上記エチレンオキシドの仕込み量を、それぞれ減少および増加させたこと以外、実質的に上記の操作を繰り返し、それぞれ、 $M_n = 2000$ および $M_n = 10000$ のポリマーを得た。それぞれのポリマーを、以下、PEG2000およびPEG10000と略記する。なお、 $M_n$ 値はPEGセグメントの分子量を表す。

#### 20 実施例1: J1センサーチップ上へのPEGの固定化

製造例1に従って得られる各ポリマーをpH=8.0のボロンバッファーに溶解し、SH含有PEGに換算して1、5、10、20、50  $\mu\text{g/ml}$ の溶液を用意した(ここでの濃度はSH含有PEGに関する値であり、実際のサンプルはOH末端を含むのでPEG濃度としては二倍程度の濃度となっている)。この溶液を1時間J1センサーチップ(BIACORE由来)に5  $\mu\text{l/分}$ の流速で流した後に、10  $\mu\text{l/分}$ の流速で0.5%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を30分流すことで非特異吸着物を洗い流し、該チップの金表面上に結合した物質の定量を行った。

定量の結果は、それぞれPEG2000、PEG5000およびPEG100

- 00を吸着させる前(RU<sub>start</sub>)および吸着させ、そしてSDS洗浄後(RU<sub>end</sub>)のRU値(表面プラズモン共鳴を応用したB I A C O R Eバイオセンサーステムにおいて、特定波長のレーザー光を全反射するように照射し屈折率を測定することにより、表面に吸着された物質の量1 ng/mm<sup>2</sup>が1000RUに対応するように設定された係数)を求め、RU<sub>end</sub>値からRUスタート値を差し引いた値をRU飽和値として示す。さらに、これらのRU飽和値をポリマーの分子量で割って1 nm<sup>2</sup>あたりに吸着されたポリマーの本数を固定されたポリマーの密度とした。

以上の結果を下記表1にまとめる。

10 表1：各調製表面の特性

ポリマー	表面に流した ポリマーの濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	RU飽和値	固定された ポリマーの密度 (本/nm <sup>2</sup> )
PEG2000	100	1500	0.56
15 PEG5000	50	1500	0.18
PEG10000	100	2300	0.14

#### 実施例2：ポリマー吸着表面への各種タンパク質の吸着特性

- 実施例1で調製した各調製表面を有するJ1センサーチップと比較としてのC  
20 M5(デキストランをJ1センサーチップに吸着：B I A C O R E由来)との各  
表面に、ウシ血清アルブミン(BSA：分子量69000、等電点 4.9)リ  
ゾチーム(Lysozyme：分子量14300、等電点 11)およびアビジ  
ン(Avidin：分子量68000、等電点 10~10.5)の1mg/m  
l(10mMのPBS, pH7.4)溶液を5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ で20分間流し、吸着  
25 曲線を得た後、実施例1と同様にして各RU値を得た。BSA、Lysozyme  
およびAvidinの吸着量(RU)を、それぞれ、下記表2、表3、および  
表4に示す。

表2：各表面のBSA吸着量 [RU]

	ポリマー	タンパク質吸着直後
	PEG2000	1154.7
	PEG5000	499.6
5	PEG10000	645.6
	CM5	123.5

表3：各表面のLysozyme吸着量 [RU]

	ポリマー	タンパク質吸着直後
10	PEG2000	1358.0
	PEG5000	1038.0
	PEG10000	1413.4
	CM5	18775.0

15 表4：各表面のAvidin吸着量 [RU]

	ポリマー	タンパク質吸着直後
	PEG2000	2364.2
	PEG5000	1710.4
	PEG10000	1784.4
20	CM5	32694.9

以上より、PEG2000、PEG5000およびPEG10000は、デキストランが表面に吸着されたCM5に比べ、各種タンパク質の非特異的吸着が有意に低減し、特に、LysozymeとAvidinについては、約1/15～  
25 1/20に低減している。

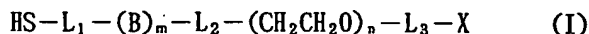
#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、バイオセンサー表面への生体成分等の非特異的吸着等を排除したセンサーチップが提供される。したがって、バイオセンサー製造業およびそのようなセンサーを使用する診断業等で利用可能である。

## 請 求 の 範 囲

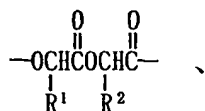
1. 有効成分としての下記一般式 (I) で表されるポリマー、溶媒および、場合により、添加剤を含んでなる、表面プラズモン共鳴 (SPR) を応用したバイオセンサーの表面を形成するためのポリマー組成物:

5 一般式 (I)

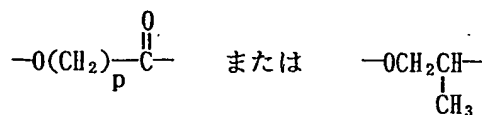


上式中、 $\text{L}_1$ 、 $\text{L}_2$ および $\text{L}_3$ は独立して、原子価結合またはリンカーを表し、但し、 $m$ が0である場合には、 $\text{L}_1$ と $\text{L}_2$ は一緒になって原子価結合または1個のリンカーとなることができ、

10 Bは式



15



を表し、ここで $\text{R}^1$ および $\text{R}^2$ は独立して、水素原子、炭素原子1~5個のアルキル基であり、そして $p$ は2~5の整数であり、

20  $x$ は水素原子、官能基またはリガンドを表し、

$m$ は0~10,000の整数であり、そして

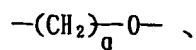
$n$ は10~20,000の整数である。

2. 該バイオセンサーの表面が、金、銀、白金およびアルミニウムからなる群より選ばれる少なくとも1種の金属から作製されており、そして該ポリマーがそ

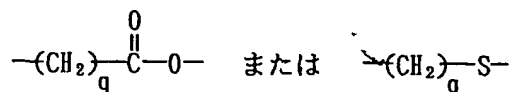
25 のポリマー分子中のメルカプト基を介して該表面に化学吸収 (または吸着) されるものである請求項1記載のポリマー組成物。

3. 式 (I) における $m$ が0~10,000であり、

$\text{L}_1$ が原子価結合、



5



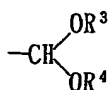
のリンカーを表すか、あるいはmが0である場合には、 $L_1$ と $L_2$ は一緒になって、  
上記で $L_1$ について定義したリンカーであることができ、ここで、qは2～6の  
整数であり、あるいはmが0以外の場合には、 $L_2$ は $-\text{O}-$ または $-\text{O}-\text{CH}_2\text{C}$

10  $\text{H}_2-\text{O}$ であり、

$L_3$ が原子価結合または $-(\text{CH}_2)_r-$ であり、ここでrは1～6の整数であり、  
そして

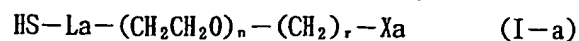
Xが水素原子；アルデヒド基（ $-\text{CHO}$ ）；水酸基；アミノ基；

15

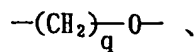


の基、ここで、 $R^3$ および $R^4$ は独立して $\text{C}_{1-10}$ アルキル基を表すか、あるいは  
 $R^3$ と $R^4$ は一緒になって、 $\text{C}_{1-6}$ アルキルで置換されていてもよいエチレン基を  
形成する原子団である； $-\text{NR}^5\text{R}^6$ の基、ここで $R^5$ および $R^6$ は独立して、水素  
20 原子または $\text{C}_{1-6}$ アルキル基であり、但し、 $R^5$ および $R^6$ はいずれか一方が水素  
原子以外である；アクリロイル基；メタクリロイル基；ビニルベンジル基；アリ  
ル基；およびパラトルエンスルホン基からなる群より選ばれる官能基または糖  
残基；ビオチン；抗原もしくは抗体および核酸からなる群より選ばれるリガンド  
25 を表す、請求項1または2記載のポリマー組成物。

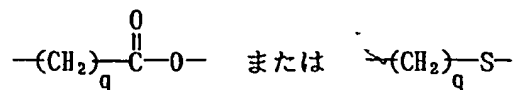
4. 式(I)で表されるポリマーが一般式(I-a)



式中、Laは

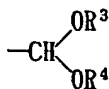


5



を表し、 $q$  は 2～6 の整数であり、 $\text{Xa}$  は、アルデヒド基または

10



の基、ここで、 $\text{R}^3$  および  $\text{R}^4$  は独立して  $\text{C}_{1-10}$  アルキル基を表すか、あるいは  $\text{R}^3$  と  $\text{R}^4$  は一緒になって  $\text{C}_{1-6}$  アルキル基で置換されていてもよいエチレン基を形成する原子団である、を表し、

15  $n$  は 10～20,000 の整数であり、そして

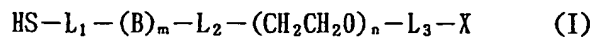
$r$  は 1～6 の整数である

で表される請求項 1～3 のいずれかに記載のポリマー組成物。

5. 下記一般式 (I) で表されるポリマーが、その片末端に存在するメルカプト基を介してセンサーチップ表面に吸収（または吸着）した表面プラズモン共鳴 (SPR) を検出するためのバイオセンサーチップ。

20

一般式 (I)

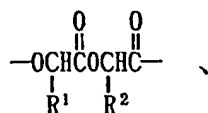


上式中、 $\text{L}_1$ 、 $\text{L}_2$  および  $\text{L}_3$  は独立して、原子価結合またはリンカーを表し、但し、 $m$  が 0 である場合には、 $\text{L}_1$  と  $\text{L}_2$  は一緒になって原子価結合または 1 個の

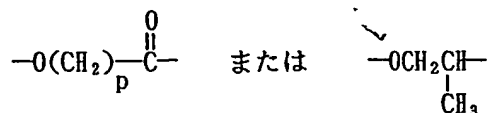
25

リンカーとなることができ、  
B は式





5



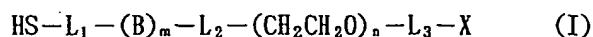
を表し、ここで $\text{R}^1$ および $\text{R}^2$ は独立して、水素原子、炭素原子1～5個のアルキル基であり、そして $p$ は2～5の整数であり、

- 10  $x$ は水素原子、官能基またはリガンドを表し、  
 $m$ は0～10,000の整数であり、そして  
 $n$ は10～20,000の整数である。

6. 該センサーチップ表面が、金、銀、白金およびアルミニウムからなる群より選ばれる少なくとも1種の金属から作製されている請求項5記載のバイオセンサーチップ。

7. 表面プラズモン共鳴 (SPR) を応用したバイオセンサーチップの表面を形成するための、下記一般式 (I) で表されるポリマーの使用：

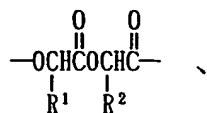
一般式 (I)



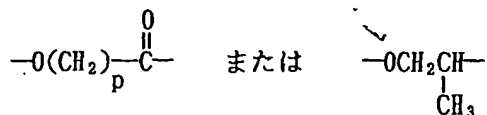
- 20 上式中、 $\text{L}_1$ 、 $\text{L}_2$ および $\text{L}_3$ は独立して、原子価結合またはリンカーを表し、但し、 $m$ が0である場合には、 $\text{L}_1$ と $\text{L}_2$ は一緒になって原子価結合または1個のリンカーとなることができ、

Bは式

25



5



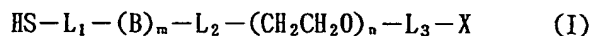
を表し、ここで $\text{R}^1$ および $\text{R}^2$ は独立して、水素原子、炭素原子1～5個のアルキル基であり、そして $p$ は2～5の整数であり、

10  $x$ は水素原子、官能基またはリガンドを表し、

$m$ は0～10,000の整数であり、そして

$n$ は10～20,000の整数である。

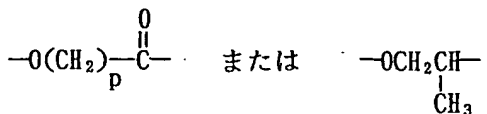
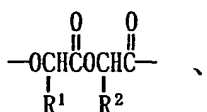
8. 一般式(I) :



15 上式中、 $\text{L}_1$ 、 $\text{L}_2$ および $\text{L}_3$ は独立して、原子価結合またはリンカーを表し、但し、 $m$ が0である場合には、 $\text{L}_1$ と $\text{L}_2$ は一緒になって原子価結合または1個のリンカーとなることができ、

$\text{B}$ は式

20



25

を表し、ここで $\text{R}^1$ および $\text{R}^2$ は独立して、水素原子、炭素原子1～5個のアルキル基であり、そして $p$ は2～5の整数であり、

$x$ は水素原子、官能基またはリガンドを表し、

$m$ は0～10,000の整数であり、そして

nは10～20,000の整数である

で表されるポリマーの溶液もしくは懸濁液を金、銀、白金およびアルミニウムからなる群より選ばれる表面を有するセンサーチップの表面と接触させ、該ポリマーを、そのポリマー中の片末端に存在するメルカプト基を介して該表面に化学吸着または化学吸収させ、次いで必要により、該ポリマー中の官能基Xを介してリガンドを共有結合させることを特徴とする表面プラズモン共鳴（SPR）を応用するバイオセンサーチップの作製方法。

10

15

20

25

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03886

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> G01N33/543, G01N21/76		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> G01N33/543, G01N21/76		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2001 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2001 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OSTUNI, E. et al., "The interaction of proteins and cells with self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold and silver", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Vol.15 (1999) pp.3-30	1-8
Y	PAVER, K. D. et al., "SPR analysis of the total reduction of protein adsorption to surfaces coated with mixtures of long- and short-chain polyethylene oxide block copolymers" Biomaterials Vol.20, No.9 (1999) pp.885-890 Abstract	1-8
Y	WO 96/32434 A (KATAOKA K), 17 October, 1996 (17.10.96), & JP 8-530892 A & EP 852243 A & US 5973069 A	1-8
Y	WO 96/33233 A (KATAOKA K), 24 October, 1996 (24.10.96), & JP 8-531619 A & EP 822217 A & US 5925720 A	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 July, 2001 (09.07.01)		Date of mailing of the international search report 24 July, 2001 (24.07.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03886

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97/06202 A (KATAOKA K), 20 February, 1997 (20.02.97), & JP 9-508315 A & EP 844269 A & US 5929177 A	1-8

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO1/03886

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> G01N33/543, G01N21/76		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> G01N33/543, G01N21/76		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2001年 日本国登録実用新案公報 1994-2001年 日本国実用新案登録公報 1996-2001年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CA (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	OSTUNI, E. et al "The interaction of proteins and cells with self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold and silver" Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Vol. 15(1999) p. 3-30	1-8
Y	PAVER, K. D. et al "SPR analysis of the total reduction of protein adsorption to surfaces coated with mixtures of long- and short-chain polyethylene oxide block copolymers" Biomaterials Vol. 20, No. 9(1999) p. 885-890 Abstract	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	09.07.01	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 山村 祥子 電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 96/32434 A (KATAOKA K) 17. 10月. 1996 (17. 10. 96) &JP 8-530892 A&EP 852243 A&US 5973069 A	1-8
Y	WO 96/33233 A (KATAOKA K) 24. 10月. 1996 (24. 10. 96) &JP 8-531619 A&EP 822217 A&US 5925720 A	1-8
Y	WO 97/06202 A (KATAOKA K) 20. 2月. 1997 (20. 02. 97) &JP 9-508315 A&EP 844269 A&US 5929177 A	1-8

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**